



TITLE:

Studies on development of analytical methods to quantify protein aggregates and prediction of soluble/insoluble aggregate-formation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Fukuda, Jun

CITATION:

Fukuda, Jun. Studies on development of analytical methods to quantify protein aggregates and prediction of soluble/insoluble aggregate-formation. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19025>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	福田 潤
論文題目	Studies on development of analytical methods to quantify protein aggregates and prediction of soluble/insoluble aggregate-formation (タンパク質の重合体に関する分析法開発及び可溶性/不溶性重合体形成予測に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>医薬品市場におけるバイオ医薬品が占める割合は年々増加しており、2012年の全世界における医薬品売上トップ10のうち7品目を占めている。その中でも、抗体医薬品は6品目を占め、対象疾患も自己免疫疾患・各種がん等、幅広く患者のQOL向上に大きく寄与している。</p> <p>バイオ医薬品は、薬剤の主成分がタンパク質であるため、一次構造・糖鎖構造・高次構造の違いにより、様々な不均一性が生じることが他の医薬品と大きく異なる。それらのタンパク質製剤の類縁体は、有効性・安全性の観点からリスクアセスメントが行われ、リスクに応じた管理が求められる。</p> <p>タンパク質の重合体は古くから安全性への懸念が示されており、<i>in vitro</i>の試験検討結果から、重合体がB細胞受容体と結合し、ヘルパーT細胞への抗原提示を加速させることにより、免疫反応を引き起こすことが知られている。また、臨床試験では、免疫グロブリン製剤の試験成績から、重合体の投与により補体が活性化されること、及びヒスタミン放出によるアナフィラキシーのリスクが上昇することが報告されている。医薬品の最も重篤な副作用のひとつとして、免疫反応を示すことが挙げられることから、他の類縁体と比べ、重合体の安全性へのリスクは高いと考えられている。以上の背景から、タンパク質の重合体は厳密な管理が必要とされる。</p> <p>重合体を管理する上で重要な点として、①重合体含量を正しく評価すること、②保存期間中の重合体増加を防ぐこと、の2点が挙げられる。本研究では、タンパク質の重合体をより正確で多角的に評価するための分析法を開発・提示することを目的とした。また、可溶性/不溶性重合体形成に大きく関与する因子を統計的に洗い出し、可溶性/不溶性重合体形成のメカニズム、及びその抑制方法について提言することを目的とした。</p> <p>第1章では、タンパク質の重合体に関する分析法として、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（SE-HPLC）に注目し、その分離法を改良した。SE-HPLCは簡便であることに加え、試験法の精度が優れており、最も汎用されている。しかし、タンパク質製剤の保存中の安定性向上のために添加される界面活性剤に由来する夾雑ピークが現れることや、重合体がカラム上部に吸着するため従来の SE-HPLC ではそれらを検出できていない可能性が指摘されている。そこで本研究では、逆相とサイズ排除のマルチモードカラムである MSpak GF-4A をプレカラムとして接続することにより、界面活性剤をプレカラムに特異的に吸着させることができることを示した。さらにタンパク質毎に最適なカラム温度に設定することにより、タンパク質の重合体の吸着をほぼ完全に抑制できることを示した。</p>			

第2章では、SE-HPLCを補完する新たな試験法としてホローファイバーフローフィールドフローフラクショネーション（HF5）に注目し、その分離条件を詳細に検討した。SE-HPLC以外のタンパク質の重合体を評価する試験法として、超遠心分析法（AUC）やアシンメトリックフローフィールドフローフラクショネーション法（AF4）が知られている。これらは、樹脂との接触が無く、重合体の分画範囲も広いため、SE-HPLCを補完する試験法として注目されている。しかし、AUCは一度に測定できる検体数が少ないことに加え、重合体含量が少ない試料の精度が他の試験法と比較して悪いことが欠点として挙げられる。また、AF4はAUCと比較してハイスループットであるが、ルーチン分析に不向きであるという欠点を持つ。そこで、HF5に注目し、移動相の塩濃度や他の物理条件が分離に及ぼす影響を精査した。これを基礎に分離条件を至適化したところ、非常に広範囲のタンパク質試料に対して、本法を適用できることを明らかにした。またその性能はAUCやAF4に比べ十分優位であることを示した。

第3章では、可溶性/不溶性重合体形成を予測する方法について検討した。タンパク質製剤の重合体増加の抑制方法に関する研究は近年注目を集めており、特に対象試料に対して、適切な溶媒あるいは試験液を選択するための複数のアプローチが報告されている。しかし、同一組成の試験液を用いてタンパク質間の重合体形成を比較し、それを基に抑制方法を考察した例は少ない。そこで本研究では、相補性決定領域（CDR）以外はほぼ同一のアミノ酸配列を有する8つのIgG1抗体をモデルとして、同一組成の試験液中を用いて、示差走査熱量測定（DSC）、蛍光プローブを用いた蛍光スペクトル分析（ANS-FL）、及び動的光散乱測定法（DLS）により各抗体の物理化学的パラメータを得ると共に、CDRのアミノ酸配列より等電点（*pI*）及び疎水性を算出した。また、熱ストレスによる各抗体の可溶性/不溶性重合体の増加量をSE-HPLCにより評価し、重合体形成に影響する物理化学的パラメータを統計的に洗い出した。その結果、DSCより得られる熱変性温度（*T_m*）とCDRの*pI*が低いほど可溶性重合体が形成しやすいこと、及びANS-FLより得られる蛍光強度とCDRの*pI*が高いほど不溶性重合体が形成しやすいことが明らかになった。従って、これらのパラメータを事前に評価しておくことで、保存期間中の重合体形成を予測できると提言した。更に、重合体と不溶性重合体形成に関わる因子が異なることから、可溶性/不溶性重合体形成に対して異なるメカニズムを提唱した。これを基に、可溶性重合体を抑制するためには、非変性状態のタンパク質の安定化と変性状態へ移行する際の活性化エネルギーを高めることが有効であり、不溶性重合体形成を抑制するためには、タンパク質中の疎水性コアを低減することが有効であると考えた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

医薬品市場において急成長を遂げているバイオ医薬品の品質管理において、重合体を管理することはそのリスクの高さから不可欠となってきた。重合体を管理する上で重要な点として、重合体含量の正確な定量と、保存期間中の重合体の増加を抑制することが挙げられる。本研究では SE-HPLC 及び HF5 の分析法の改良・構築を通じて、より正確な重合体定量を実現とした。また、可溶性重合体及び不溶性重合体形成に関連する因子を洗い出し、重合体形成関連因子から可溶性重合体と不溶性重合体形成のスキームを考察することで、可溶性及び不溶性重合体の形成を抑制する方法を提案した。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. タンパク質の重合体評価法のひとつである SE-HPLC 法において、逆相とサイズ排除のマルチモードカラムをプレカラムとして用い、さらにカラム温度をタンパク質毎に厳密に制御することにより、界面活性剤に由来する夾雑ピークが出現するという課題をほぼ完全に解決できることを明らかにした。
2. 至適条件の設定が難しく、抗体への適用例も無かった HF5 について、各種分析パラメータや移動相組成を検討し最適化することにより、適用範囲を大きく拡大できることを明らかにした。また、最適化条件での HF5 は、AUC や AF4 と同等以上の性能を有していることを示した。
3. IgG1 抗体について、DSC より得られる T_m と CDR の pI が低いほど可溶性重合体が形成しやすいこと、及び ANS-FL より得られる蛍光強度と CDR の pI が高いほど不溶性重合体が形成しやすいことを明らかにした。また、これらの重合体形成関連因子から可溶性及び不溶性重合体の形成スキームをそれぞれ考察し、重合体形成を抑制するための対策法を提言した。

以上のように、本論文は、タンパク質重合体の品質管理に必要な重合体定量法を提示したことと重合体形成抑制に対する新しいアプローチを示したものであり、分析化学、生化学、タンパク質化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年2月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）